

19



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



11 Veröffentlichungsnummer: **0 441 468 A2**

12

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 91250038.6

51 Int. Cl.<sup>5</sup>: **A61K 49/00, A61B 8/00**

22 Anmeldetag: 11.02.91

30 Priorität: 09.02.90 DE 4004430

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
14.08.91 Patentblatt 91/33

84 Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE**

71 Anmelder: **SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT**  
**Berlin und Bergkamen**  
**Müllerstrasse 170/178 Postfach 65 03 11**  
**W-1000 Berlin 65(DE)**

72 Erfinder: Rössling, Georg, Dr.  
**Oranienburger Chaussee 60 c**  
**W-1000 Berlin 28(DE)**  
Erfinder: Albayrak, Celal, Dr.  
**Frankenstrasse 2**  
**W-1000 Berlin 30(DE)**  
Erfinder: Rothe, Matthias, Dr.  
**Ringbahnstrasse 72**  
**W-1000 Berlin 42(DE)**  
Erfinder: Siegert, Joachim, Dr.  
**Menzelstrasse 26**  
**W-1000 Berlin 41(DE)**

54 **Aus Polyaldehyden aufgebaute Kontrastmittel.**

57 Mikropartikel-bestehend aus bioabbaubaren Polymeren,  
dadurch gekennzeichnet, daß sie aufgebaut sind aus  
polymerisierbaren Aldehyden, die gewünschtenfalls  
zur Copolymerisation fähige Zusätze und/oder  
Crosslinker enthalten, gegebenenfalls Tensiden oder  
Tensidgemischen, Gasen und/oder leichtflüchtigen  
Flüssigkeiten in freier oder gebundener Form, Kopp-  
lungsagentien, gegebenenfalls über diese Kopp-  
lungsagenzien gebundenen Bio- oder Makromolekü-  
len sowie gegebenenfalls diagnostisch oder thera-  
peutisch wirksamen Bestandteilen,  
sind als Ultraschall-Kontrastmittel geeignet.

**EP 0 441 468 A2**

# AUS POLYALDEHYDEN AUFGEBAUTE KONTRASTMITTEL

Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand, das heißt neue Mikropartikel, diese enthaltende pharmazeutische Mittel, deren Verwendung in der Ultraschall-diagnostik sowie Verfahren zur Herstellung dieser Mikropartikel und pharmazeutischen Mittel.

Es ist bekannt, daß durch periphere Injektion von Lösungen, die feine Gasblasen enthalten, cardiale Echokontaste erzielt werden können (Roelandt J., Ultrasound Med. Biol. 8: 471-492, 1982). Diese Gasblasen werden in physiologisch verträglichen Lösungen z.B. durch Schütteln, andere Agitation oder durch Zusatz von Kohlendioxid erhalten. Sie sind jedoch hinsichtlich Anzahl und Größe nicht einheitlich und können nur unzulänglich reproduziert werden. Auch sind sie in der Regel nicht stabilisiert, so daß ihre Lebensdauer gering ist. Ihre mittleren Durchmesser liegen meist über Erythrocytengröße, so daß keine Lungenkapillarpassage mit nachfolgender Kontrastierung von Organen wie linkes Herz, Leber, Niere oder Milz möglich ist. Darüber hinaus eignen sie sich nicht für Quantifizierungen, da sich das von ihnen erzeugte Ultraschallecho aus mehreren, nicht voneinander zu trennenden Prozessen wie Blasenentstehung, Koaleszenz und Auflösung zusammensetzt. So ist es z.B. nicht möglich, mit Hilfe dieser Ultraschall-Kontrastmittel über die Messung des Kontrastverlaufs im Myokard Aussagen über die Transitzeiten zu gewinnen.

In der EP 0 131 540 ist die Stabilisierung der Gasblasen durch Zucker beschrieben. Damit wird zwar die Reproduzierbarkeit und Homogenität des Kontrasteffektes verbessert, eine Lungenpassage überstehen diese Blasen jedoch nicht.

In den EP 0 122 624 und 0 123 235 wird beschrieben, daß der gasblasenstabilisierende Effekt von Zuckern, Zuckeralkoholen und Salzen durch Zusatz von Tensiden verbessert wird. Eine Lungenkapillargängigkeit und die Möglichkeit zur Darstellung des arteriellen Gefäßschenkels und verschiedener Organe wie Leber oder Milz ist bei diesen Ultraschallkontrastmitteln gegeben. Der Kontrasteffekt ist hierbei jedoch auf das Gefäßlumen beschränkt, da die Bläschen nicht von den Gewebezellen aufgenommen werden.

Keines der bisher bekannten Ultraschall-Kontrastmittel verbleibt längere Zeit unverändert im Körper. Eine Organdarstellung mit ausreichender Signalintensität durch selektive Anreicherung nach i.v. Gabe oder Quantifizierungen sind daher nicht möglich.

Eine Verkapselung von Gasen, wie beispielsweise Luft als Ultraschall-Kontrastmittel, wird in der DE-OS 38 03 972 beschrieben. Das hierbei ver-

wendete Wandmaterial besteht aus bioabbaubarem synthetischem Material, wie vor allem Cyanacrylat und Polylactid.

Diese Mikropartikel sind jedoch - insbesondere in größerem Maßstab sowie im Hinblick auf ihre Aufarbeitung - schwierig herstellbar. So ist vor allem die breite Größenverteilung der Partikel von Nachteil.

Es bestand daher die Aufgabe, Ultraschall-Kontrastmittel zu schaffen, die diese Nachteile nicht aufweisen. Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung, d.h. durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Mikropartikel gelöst.

Diese Mikropartikel bestehen aus bioabbaubaren Polymeren, dadurch gekennzeichnet, daß sie aufgebaut sind aus polymerisierbaren Aldehyden, die gewünschtenfalls zur Copolymerisation fähige Zusätze und/oder Crosslinker enthalten, gegebenenfalls Tensiden oder Tensidgemischen, Gasen und/oder leichtflüchtigen Flüssigkeiten in freier oder gebundener Form, Kopplungsagentien, gegebenenfalls über diese Kopplungsagentien gebundenen Bio- oder Makromolekülen sowie gegebenenfalls diagnostisch oder therapeutisch wirksamen Bestandteilen.

Alle erfindungsgemäßen Polymeren (Homopolyaldehyde oder Copolyaldehyde) haben im allgemeinen Molekulargewichte von 1.000 - 30.000 d, bevorzugt 1.000 - 12.000 d. Die Partikel sind abbaubar in Blut und Plasma.

Die am Aufbau der Mikropartikel hauptsächlich beteiligten polymerisierten Aldehyde werden aus folgenden polymerisierbaren Aldehyden ausgewählt:

I.  $\alpha, \beta$ -ungesättigten Aldehyden, wie zum Beispiel

Acrolein  
Crotonaldehyd  
Propionaldehyd

II.  $\alpha$ -substituierten Acroleinderivaten, wie zum Beispiel

$\alpha$ -Methylacrolein  
 $\alpha$ -Chloroacrolein  
 $\alpha$ -Phenylacrolein  
 $\alpha$ -Ethylacrolein  
 $\alpha$ -Isopropylacrolein  
 $\alpha$ -n-Butylacrolein  
 $\alpha$ -n-Propylacrolein

III. Dialdehyden, wie zum Beispiel

Glutaraldehyd, Succinaldehyd oder deren Derivate oder deren Mischung n mit zur Copolymerisation fähigen Zusätzen, wie zum Beispiel:

$\alpha$ -substituierten Acroleinen  
 $\beta$ -substituierten Acroleinen  
Ethylcyanacrylaten

Methylcyanacrylaten  
 Butylcyanacrylaten  
 Hexylcyanacrylaten  
 Methylmetacrylaten  
 Vinylalkoholen  
 Acrylsäuren  
 Methacrylsäuren  
 Acrylsäurechloriden  
 Methacrylsäurechloriden  
 Acrylnitril  
 Methacrylnitrilen  
 Acrylamiden  
 Substituierten Acrylamiden  
 Hydroxymethylmethacrylaten  
 Mesityloxid  
 Dimethylaminoethylmethacrylaten-2-  
 Vinylpyridinen  
 N-vinyl-2-Pyrrolidinon  
 Bevorzugt sind dabei Acrolein und Glutaraldehyd.

Die gegebenenfalls am Aufbau der Mikropartikel beteiligten Tenside werden aus ionogenen oder nicht-ionogenen oberflächenaktiven Substanzen (Tensiden), wie z.B.

Polyethylenoxid  
 Polyoxyethylenpolyoxypropylenen wie Pluronic<sup>(R)</sup> F 68, Pluronic<sup>(R)</sup> F 108, Pluronic<sup>(R)</sup> F 127,  
 Polyethylenglykol, Poloxamin 908, Polaxamer 407  
 Carbonsäuresalzen, wie zum Beispiel: Natriumoleat  
 Polyoxyethylenfettsäureestern, wie zum Beispiel:  
 Polyoxyethylenstearat  
 Natriumdioctylsulfosuccinat  
 Polyglutaraldehydnatriumhydrogensulfat-Addukt  
 Polyacrolein-Natriumhydrogensulfat-Addukt  
 Polyvinylsulfonsäure

ausgewählt. Sie können allein oder in Form ihrer Gemische verwendet werden.

Bevorzugt sind hiervon:  
 Polyglutaraldehydnatriumsulfat-Addukt,  
 Polyacrolein-Natriumhydrogensulfat-Addukt, Pluronic<sup>(R)</sup> F 68, Pluronic<sup>(R)</sup> F 108 und Pluronic<sup>(R)</sup> F 127.

Besitzen die zum Aufbau der Mikropartikel benutzten polymerisierbaren Aldehyde oberflächenaktive Eigenschaften, so kann auf die Verwendung von Tensiden verzichtet werden. Als Beispiel derartiger Aldehyde sei der Glutaraldehyd genannt.

Als in den Mikropartikeln in freier oder gebundener Form enthaltene Gase bzw. leichtflüchtige Flüssigkeiten - bevorzugt sind hierbei Flüssigkeiten mit einem Siedepunkt unter 60 °C - sind u.a. geeignet:

Ammoniak

Luft

Edelgase (Helium, Neon, Argon, Xenon, Krypton)

Schwefelhalogenide, wie zum Beispiel: Schwefelhexafluorid,  
 Stickstoff

Kohlenstoffoxide

Sauerstoff

Wasserstoff,

Kohlenwasserstoffe oder deren Gemische, wie zum

5 Beispiel:

Methan

Ethan

Propan

Butan

10 Pentan

Neopentan

Isopentan

Cyclopentan

Ethylen

15 Propylen

Acetylen

3,3-Dimethyl-1-Butin

2,3-Pentadien

2-Methyl-2-Buten

20 2-Methyl-1,3-Butadien

2-Butin

2-Methyl-1-Buten

3-Methyl-1-Buten,

halogenierte Kohlenwasserstoffe oder Gemische,

25 wie zum Beispiel:

Methylenchlorid

1,1-Dichlorethylen

Isopropylchlorid

Dibromdifluormethan

30 Brommethan,

Ether, wie zum Beispiel: Dimethylether, Diethylether oder fluoridierte Ether,

oder Verbindungen wie zum Beispiel:

Dimethylaminoacetone

35 Propylenoxid

N-Ethylmethylamin

N-Ethylidimethylamin

Furan.

Bevorzugt sind hiervon: Luft, Argon, Xenon, Schwefelhexafluorid, Propan, Butan und Furan.

Als am Aufbau der Mikropartikel beteiligten Kopplungsagenzien sind vor allem geeignet:

1. Aminogruppenhaltige Verbindungen, wie zum

Beispiel:

46 Hydroxylamin

Butylamin

Allylamin

Ethanolamin

Trishydroxymethylaminomethan

50 3-Amino-1-propansulfonsäure

5-Aminovaleriansäure

8-Aminooctansäure

D-Glucosaminhydrochlorid

Aminogalactose

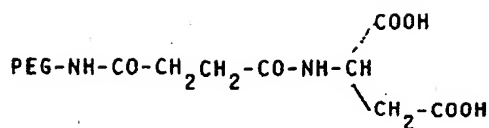
55 Aminosorbit

Aminomannit

Diethylaminoethylamin

Aniline

Sulfonilsäureamid		
Cholin		
N-Methylglucamin		
Piperazin		
1,6-Hexandiamin	5	
Harnstoff		
Hydrazin		
Glycin		
Alanin		
Lysin	10	
Serin		
Valin		
Leucin		
Peptide		
Proteine	15	
Albumin		
Humanserumalbumin		
Polylysin		
Gelatine		
Polyglykolamine	20	
Aminopolyalkohole		
Dextransulfate mit Aminogruppen		
N-Aminopolyethylenglycol (HO-PEG-NH <sub>2</sub> )		
N,N'-Diaminopolyethylenglycol (NH <sub>2</sub> -PEG-NH <sub>2</sub> )		
Antikörper	25	
Immunoglobuline		
II. Säuregruppenhaltige Verbindungen, wie z.B. :		
Carbonsäuren		
Essigsäure		
Propionsäure	30	
Buttersäure		
Valeriansäure		
Capronsäure		
Caprylsäure		
Caprinsäure	35	
Laurinsäure		
Myristinsäure		
Palmitinsäure		
Stearinsäure		
Ölsäure	40	
Linolsäure		
Linolensäure		
Cyclohexancarbonsäure		
Phenylelessigsäure		
Benzoylessigsäure	45	
Chlorbenzoesäure		
Brombenzoesäure		
Nitrobenzoesäure		
Ortho-Phthalsäure		
Meta-Phthalsäure	50	
Para-Phthalsäure		
Salicylsäure		
Hydroxybenzoesäure		
Aminobenzoesäure		
Methoxybenzoesäure	55	



(PEG-Linker-Asparaginsäure)

PEG-Linker-Glutaminsäure

PEG-Linker-DTPA

PEG-Linker-EDTA

III. Hydroxygruppenhaltige Verbindungen, wie z.B.: Alkohole

Methanol

Ethanol

Propanol

Butanol

Pentanol

Hexanol

Heptanol

Octanol

Decanol

Dodecanol

Tetradecanol

Hexadecanol

Octadecanol

Isopropylalkohol

Isobutylalkohol

Isopentylalkohol

Cyclopentanol

Cyclohexanol

Crotylalkohol

Benzylalkohol

Phenylalkohol

Diphenylmethanol

Triphenylmethanol

Zimtalkohol

Ethylenglykol

1,3-Propandiol

Glycerin

Pentaerythrit

IV. Polymerisierfähige Substanzen, wie  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Aldehyde, wie z.B.:

Acrolein

Crotonaldehyd

Propinaldehyd

 $\alpha$ -substituierte Acroleinderivate, wie z.B.: $\alpha$ -Methylacrolein $\alpha$ -Chloroacrolein $\alpha$ -Phenylacrolein $\alpha$ -Ethylacrolein $\alpha$ -Isopropylacrolein $\alpha$ -n-Butylacrolein $\alpha$ -n-Propylacrolein

Dialdehyd, wie z.B.:

Glutaraldehyd, Succinaldehyd oder deren Derivat oder deren Mischungen mit zur Copolymerisation fähigen Zusätzen, wie z.B.:

 $\alpha$ -substituierten Acroleinen

$\beta$ -substituierten Acroleinen  
 Ethylcyanacrylaten  
 Methylcyanacrylaten  
 Butylacrylaten  
 Hexylcyanacrylaten  
 Methylmetacrylaten  
 Vinylalkoholen  
 Acrylsäuren  
 Methacrylsäuren  
 Acrylsäurechloriden  
 Acrylnitril  
 Methacrylnitrilen  
 Acrylamiden  
 Substituierten Acrylamiden  
 Hydroxymethylmethacrylaten  
 Mesityloxid  
 Dimethylaminoethylmethacrylaten-2-  
 Vinylpyridinen  
 N-vinyl-2-Pyrrolidinon

Bevorzugt sind hiervon: Hydroxylamin, Trishydroxymethylaminomethan, 3-Amino-1-propansulfonsäure, D-Glucosaminhydrochlorid, Aminomannit, Harnstoff, Humanalbumin, Hydrazin, Proteine, Polyglykolamine, Aminopolyalkohole wie z.B. HO-PEG-NH<sub>2</sub> oder NH<sub>2</sub>-PEG-NH<sub>2</sub> oder säuregruppenhaltige Verbindungen wie z.B. PEG-Linker-Asparaginsäure, PEG-Linker-Glutaminsäure, PEG-Linker-DTPA und PEG-Linker-EDTA, wobei das Molekular-Gewicht des Polyethylenglycols (PEG) bis 100.000 d, vorzugsweise unter 40.000 d, liegt.

Die unter I. genannten Kopplungsagenzien sind über ihre Aminogruppe an die sich auf der Oberfläche der aus polymerisierten Aldehyden und gegebenenfalls Tensiden aufgebauten Mikropartikel befindlichen Formylgruppen kondensiert.

Ebenfalls über die Formylgruppen gebunden sind die unter IV. aufgeführten Monomere, die mit weiteren Monomeren polymerisiert sein können.

Die unter II. und III. genannten Säuren und Alkohole sind dagegen erst nach vorheriger Umwandlung der Aldehydfunktion an die Mikropartikel angekoppelt.

Durch die Wahl geeigneter, über diese Kopplungsagenzien gebundenen Bio- oder Makromoleküle, wie z.B. Enzyme, Dextrane, Immunglobuline, monoklonale Antikörper (s. weiter unten) erhält man erfindungsgemäße Mikropartikel, die eine überraschend hohe Gewebe- und Organspezifität aufweisen.

Die erfindungsgemäßen Mikropartikel enthalten gegebenenfalls diagnostisch oder therapeutisch wirksame Bestandteile zur Diagnose und Therapie von Tumoren, wie zum Beispiel

Doxorubicin  
 Actinomycin  
 Magnetit  
 Mitomycin C

Triamcinolon.

Die erfindungsgemäßen Mikropartikel weisen die eingangs geschilderten gewünschten Eigenschaften auf. Sie sind einfach und mit hoher Ausbeute herstellbar. Eine Maßstabsvergrößerung der Herstellung (up-scaling) ist ebenso wie die Reinigung der Mikropartikel problemlos.

Überraschenderweise weisen die erfindungsgemäßen Mikropartikel eine bessere Verträglichkeit auf, vor allem im Hinblick auf Herz-Kreislauf Effekte (Blutdruck, Herz-Arhythmien usw.) und zeigen kein thrombogenes Potential.

Die Partikel weisen eine schmale Größenverteilung (monodispers) auf; es ist dabei möglich, die Größe der Partikel je nach eingesetzter Konzentration der Ausgangsstoffe über einen großen Bereich zu variieren (s. weiter unten). Durch Steuerung der Herstellungsbedingungen (z.B. pH-Wert) ist es möglich, auch das Molekulargewicht in großen Bereichen zu variieren.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß die Reaktion zur Synthese der Mikropartikel durch viele Möglichkeiten ausgelöst werden kann, beispielsweise: Anionische Polymerisation durch pH-Änderung, kationische Polymerisation mit z.B. Eisensalzen, radikalische Polymerisation mit UV-Licht und durch ionisierende Strahlung.

Der für die Herstellung der Mikropartikel mögliche weite Temperaturbereich (-5 bis +80 °C) gestattet eine einfache Versuchssteuerung mit optimalen Ausbeuten bei sehr unterschiedlichen Gasen bzw. leichtsiedenden Flüssigkeiten.

Die Partikel enthalten freie Aldehydgruppen, die durch chemische Reaktionen mit anderen Molekülen kovalent verknüpft werden können. Diese Möglichkeit gestattet es, die Eigenschaften der Partikeloberfläche gezielt zu verändern, ohne die echogenen Eigenschaften zu beeinflussen. Durch Auswahl geeigneter Kopplungsagenzien läßt sich die kolloidale Stabilität beeinflussen. Insbesondere wird dadurch das für kolloidale Systeme häufig auftretende Phänomen der Agglomeration verhindert. Dies wiederum ist von großem Vorteil für die Entwicklung einer stabilen Formulierung.

Neben der Beeinflussung der Stabilität bieten sich Möglichkeiten, die Oberfläche der Partikel so zu verändern, daß ein drug-targeting möglich ist. Dies geschieht durch Ankoppelung geeigneter Bio- oder Makromoleküle (z.B. monoklonaler Antikörper), die eine hohe Gewebe- und Organspezifität bewirken (G. Gregoriadis, G. Poste "Targeting of Drugs", Plenum Press 1988, New York) oder durch Beeinflussung der Oberflächeneigenschaften der Partikel durch Adsorption von Molekülen (z.B. Tensid n).

In Abhängigkeit von der Wahl dieser Moleküle und von der Größe der Mikropartikel läßt sich eine Partikelanreicherung in/an Tumoren bzw. z.B. in

der Lunge, Leber, Milz und im Knochenmark erreichen. Die Anreicherung im Knochenmark wird insbesondere dadurch erreicht, daß kleine Partikel (< 100 nm) mit z.B. Poloxamer 407 gecoatet werden. Sind die Partikel z.B. mit Poloxamin 908 gecoatet, wird das RES-System von diesen Partikeln überwunden, und sie bleiben im Blutkreislauf (blood pool agent).

Durch mit Antikörpern gekoppelte Teilchen läßt sich eine Anreicherung der Partikel in/an Tumoren erreichen.

Ein aktives targeting läßt sich auch mit Magnetit-enthaltenden Mikropartikeln durchführen. Durch ein von außen angelegtes Magnetfeld werden die Partikel in den gewünschten Stellen im intravasalen System angereichert. Es ergibt sich hierdurch die Möglichkeit, Strömungsverhältnisse z.B. in Blutgefäßen zu untersuchen.

Mit Hilfe der mit Magnetit beladenen Partikel ist es auch möglich, durch ein von außen eingestrahltes magnetisches Wechselfeld lokal hohe Temperaturen zu erzeugen. Dies läßt sich therapeutisch ausnutzen, z.B. zur Zerstörung von Tumoren (Hyperthermie-Therapie). Außer der Verwendung eines magnetischen Wechselfeldes läßt sich ein Ultraschallfeld verwenden. Auch hierbei kommt es zu starken lokalen Temperaturerhöhungen.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Mikropartikel erfolgt dadurch, daß man eine 0 bis 40 %, vorzugsweise 0,01 bis 10 % w/v Tensid(e) und 0 bis 10 % w/v diagnostisch oder therapeutisch wirksame Bestandteile und Gase oder leichtflüchtige Flüssigkeiten enthaltende wäßrige Lösung unter Rühren, bei einer Temperatur von -5° bis +80 °C, vorzugsweise 0° bis 40 °C, einem pH-Wert von 7 bis 14, vorzugsweise 9 bis 13, innerhalb von 1 Minute bis 24 Stunden, vorzugsweise 1 Stunde bis 10 Stunden, und gegebenenfalls unter Einleiten von Gas mit copolymerisierbarem/n Aldehyd(en) bis zu einer Konzentration bezogen auf die Reaktionsmischung von 0,1 bis 50 %, vorzugsweise 3 bis 20 % w/v, sowie mit copolymerisierbaren Zusätzen einer Konzentration bezogen auf die Reaktionslösung von 0 bis 20 %, vorzugsweise 1 bis 5 % w/v, mit Crosslinker(n) einer Konzentration bezogen auf die Reaktionsmischung von 0 - 5 %, vorzugsweise 0,1 bis 1 % w/v, umsetzt,

anschließend - gegebenenfalls nach Reinigung - die so erhaltenen Mikropartikel mit einer wäßrigen Lösung, die - bezogen auf die Aldehydmenge - bis zu äquimolare Mengen an Kopplungsagenz sowie 0 bis 20 %, vorzugsweise 0,01 bis 10 % w/v Tensid(e) bezogen auf das Gesamtvolumen enthält, unter Rühren bis zu 3 Tagen, vorzugsweise bis zu 2 Tagen, bei Temperaturen von 0° bis 60 °C, vorzugsweise 5° bis 30 °C, bei einem pH-Wert von 3 bis 9, vorzugsweise 5 bis 8, umsetzt und - gewünschtenfalls nach Reinigung - diese gegeben-

nenfalls an Bio- oder Makromoleküle bindet.

Die nach der ersten Reaktionsstufe erhaltenen Polymeraldehyd-Partikel haben auf der Oberfläche Aldehydgruppen. Mit diesen Aldehydgruppen lassen sich die für Aldehyde typischen Reaktionen durchführen (R.C. Schulz, Kolloidzeitschrift und Zeitschrift für Polymere, 182 (1-2), 99 (1961); Lehrbuch der organischen Chemie "Organikum", VEB Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1984). Dadurch ist man in der Lage, auf der Partikeloberfläche Moleküle anzukoppeln, die die Oberflächeneigenschaften ändern.

Beispiele für mögliche Reaktionen der Aldehydgruppen:

- Reduktion zu Alkohol
- Oxidation zu Säuren
- Oximierung
- Iminbildung, gegebenenfalls gefolgt von Hydrierung und gegebenenfalls anschließender N-alkylierung
- Hydrazonbildung, gegebenenfalls gefolgt von Hydrierung
- Mercaptalisierung
- Acetalisierung
- Disproportionierung durch NaOH (Cannizzaro-Reaktion)
- Aldolkondensation

Die Kopplung von aminogruppenhaltigen Molekülen an die in der ersten Reaktionsstufe gebildeten Partikel erfolgt durch Umsetzung mit den Aldehydgruppen. Hierbei wählt man beispielsweise folgende experimentelle Bedingungen:

1000 mg Polyacrolein-Partikel werden in 50 ml destilliertem Wasser suspendiert. Zu dieser Partikelsuspension werden 5000 mg der umzusetzenden Substanz zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Entsprechend der Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung muß gerührt werden; bei langsamen Reaktionsgeschwindigkeiten bis 48 Stunden. Die Partikelsuspension wird anschließend dialysiert (Cut off 10000 d).

Enthalten die durch z.B. die oben angegebenen Reaktionen eingeführten Substituenten (gegebenenfalls intermediär geschützte) funktionelle Gruppen, so können diese nach dem Fachmann bekannten Verfahren in für die Kopplung an Bio- oder Makromoleküle geeignete reaktive Gruppen umgewandelt werden. Bevorzugte derartige Gruppen sind beispielsweise die Maleimidobenzoyl-, 3-Sulfomaleimido-benzoyl-, 4-(Maleimidomethyl)-cyclohexylcarbonyl-, 4-[3-Sulfo-(maleimido-methyl)-cyclohexylcarbonyl-, 4-(p-Maleimidophenyl)-butyryl-, 3-(2-Pyridyl-dithio)propionyl-, Methacryloyl-(pentamethylen)-amido-, Bromacetyl-, Jodacetyl-, 3-Jodpropyl-, 2-Bromomethyl-, 3-Mercaptopropyl-, 2-Mercaptoethyl-, Phenylisothiocyanat, 3-Aminopropyl-, Benzylester-, Ethylester-, t-Butylester, Amino-, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylamino-

, Aminocarbonyl-, Hydrazino-, Hydrazinocarbonyl-, Maleimido-, Methacrylamido-, Methacryloylhydrazinocarbonyl-, Maleimidamidocarbonyl-, Halogeno-, Mercapto-, Hydrazinotrimethylenhydrazinocarbonyl-, Aminodimethylenamidocarbonyl-, Bromcarbonyl-, Phenylendiazonium-, Isothiocyanat-, Semicarbazid-, Thiosemicarbazid-, Isocyanat-Gruppe.

Eine Aminogruppe kann beispielsweise nach literaturbekannten Methoden (z.B. mit Thiophosgen in einem Zweiphasensystem, S. Scharma, *Synthesis* 1978, 803, D.K. Johnson, *J. Med. Chem.* 1989, Vol. 32, 236) in eine Isothiocyanatgruppe umgewandelt werden.

Durch Umsetzung einer Aminofunktion mit einem Halogenessigsäurehalogenid kann eine  $\alpha$ -Halogenacetamidgruppe generiert werden (*JACS* 1969, Vol. 90, 4508; *Chem. Pharm. Bull.* 29 (1), 128, 1981), die ebenso wie z.B. die Isothiocyanatgruppe zur Kopplung an Bio- und Makromoleküle geeignet ist.

Als Substituenten, der in eine für eine Bindung an ein Makro- oder Biomolekül geeignete funktionelle Gruppe überführt werden kann, sind unter anderem Hydroxy- und Nitrobenzyl-, Hydroxy- und Carboxyalkyl- sowie Thioalkylreste mit bis zu 20 Kohlenstoffatomen geeignet. Sie werden nach dem Fachmann bekannten Literaturverfahren [*Chem. Pharm. Bull.* 33, 674 (1985), *Compendium of Org. Synthesis* Vol. 1-5, Wiley and Sons, Inc., Houben-Weyl, *Methoden der organischen Chemie*, Band VIII, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, *J. Biochem.* 92, 1413, (1982)] in die gewünschten Substituenten (zum Beispiel mit der Amino-, Hydrazino-, Hydrazinocarbonyl-, Epoxid-, Anhydrid-, Methacryloylhydrazinocarbonyl-, Maleimidamidocarbonyl-, Halogeno-, Halogenocarbonyl-, Mercapto-, Isothiocyanatgruppe als funktioneller Gruppe) umgewandelt, wobei im Falle des Nitrobenzylrestes zunächst eine katalytische Hydrierung (zum Beispiel nach P.N. Rylander, *Catalytic Hydrogenation over Platinum Metals*, Academic Press 1967) zum Aminobenzylderivat vorgenommen werden muß.

Beispiele für die Umwandlung von an aromatische oder aliphatische Reste gebundenen Hydroxy- oder Aminogruppen sind die in geeigneten Lösungsmitteln wie Tetrahydrofuran, Dimethoxyethan oder Dimethylsulfoxid, zweiphasigen wäßrigen Systemen, wie z.B. Wasser/Dichlormethan, in Gegenwart eines Säurefängers wie zum Beispiel Natriumhydroxid, Natriumhydrid oder Alkali oder Erdalkalicarbonaten wie zum Beispiel Natrium-, Magnesium-, Kalium-, Calciumcarbonat oder Poly-(4-vinylpyridin) Reillex<sup>(R)</sup> bei Temperaturen zwischen 0 °C und dem Siedepunkt des jeweiligen Lösungsmittels, vorzugsweise jedoch zwischen 20 °C und 60 °C, durchgeführten

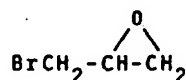
Umsetzungen mit inem Substrat der allgemeinen Formel I

Nf-L-Fu (I).

worin Nf für ein Nucleofug wie z.B. Cl, Br, J,  $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3$  oder  $\text{CF}_3\text{SO}_3$ , L für einen aliphatischen, aromatischen, arylaliphatischen, verzweigten, geradkettigen oder cyclischen Kohlenwasserstoffrest mit bis zu 20 Kohlenstoffatomen und Fu für die gewünschte funktionelle Gruppe, gegebenenfalls in geschützter Form, stehen (DE-OS 34 17 413).

Als Beispiele für Verbindungen der allgemeinen Formel I seien genannt

$\text{Br}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ ,  $\text{Br}(\text{CH}_2)_3\text{OH}$ ,  $\text{BrCH}_2\text{COOCH}_3$ ,  $\text{BrCH}_2\text{CO}_2^t\text{Bu}$ ,  $\text{ClCH}_2\text{CONHNH}_2$ ,  $\text{Br}(\text{CH}_2)_4\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{BrCH}_2\text{COBr}$ ,  $\text{BrCH}_2\text{CONH}_2$ ,  $\text{ClCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ ,  $\text{BrCH}_2\text{CONHNH}_2$ ,



,  $\text{CF}_3\text{SO}_3(\text{CH}_2)_3\text{Br}$ ,  $\text{BrCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ,  $\text{BrCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $\text{BrCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NCS}$ .

Umwandlungen von Carboxy-Gruppen können zum Beispiel nach der Carbodiimid-Methode (Fieser, *Reagents for Organic Syntheses* 10, 142), über ein gemischtes Anhydrid [*Org. Prep. Proc. Int.* 7, 215 (1975)] oder über einen aktivierten Ester (*Adv. Org. Chem. Part B*, 472) durchgeführt werden.

Die so erhaltenen kopplungsagenz-tragenden Mikropartikel können auch an Bio- oder Makromoleküle geknüpft sein, von denen bekannt ist, daß sie sich in dem zu untersuchenden Organ oder Organteil besonders anreichern. Solche Moleküle sind beispielsweise Enzyme, Hormone, Polysaccharide wie Dextrane oder Stärken, Porphyrine, Bleomycine, Insulin, Prostaglandine, Steroidhormone, Aminosucker, Aminosäuren, Peptide wie Polylisin, Proteine (wie zum Beispiel Immunoglobuline, monoklonale Antikörper, Lektine), Lipide (auch in Form von Liposomen) und Nukleotide vom DNA- oder RNA-Typ. Besonders hervorzuheben sind Konjugate mit Albuminen, wie Humanserumalbumin, Antikörpern, wie zum Beispiel monoklonale, für tumorassoziierte Antigene spezifische Antikörper oder Antimyosin. Anstelle von biologischen Makromolekülen können auch geeignete synthetische Polymer wie Polyethylenimine, Polyamide, Polyhamstoffe, Polyether wie Polyethylenglykole und Polythioharnstoffe angeknüpft werden. Die hieraus gebildeten pharmazeutischen Mittel eignen sich beispielsweise zur Anwendung in der Tumor- und

Infarkt-Diagnostik sowie Tumorthherapie. Monoklonale Antikörper (zum Beispiel Nature 256, 495, 1975) haben gegenüber polyklonalen Antikörpern die Vorzüge, daß sie spezifisch für eine antigene Determinante sind, eine definierte Bindungsaffinität besitzen, homogen sind (damit wird ihre Reindarstellung wesentlich einfacher) und in Zellkulturen in großen Mengen herstellbar sind. Als solche sind zum Beispiel für die Tumordarstellung monoklonale Antikörper bzw. deren Fragmente Fab und F(ab')<sub>2</sub> geeignet, die zum Beispiel spezifisch sind für humane Tumore des Gastrointestinaltraktes, der Brust, der Leber, der Blase, der Keimdrüsen und von Melanomen [Cancer Treatment Repts. 68, 317, (1984), Bio Sci 34, 150, (1984)] oder gegen Carcinomembryonales Antigen (CEA), Humanes Choriongonadotropin ( $\beta$ -HCG) oder andere tumorständige Antigene, wie Glycoproteine, gerichtet sind [New Engl. J. Med. 298, 1384, (1973), US-P 4,331,647]. Geeignet sind unter anderem auch Anti-Myosin, Anti-Insulin- und Anti-Fibrin-Antikörper (US-P 4,036,945).

Coloncancer lassen sich mit Hilfe von Mikropartikel-Konjugaten mit dem Antikörper 17-1A (Centocor, USA) diagnostisch nachweisen.

Im Falle der Antikörper-Konjugate darf die Bindung des Antikörpers an die Mikropartikel nicht zum Verlust oder zur Verminderung der Bindungsaffinität und Bindungsspezifität des Antikörpers zum Antigen führen. Dies kann entweder durch Bindung an den Kohlenhydrat-Anteil im Fc-Teil des Glycoproteins bzw. in den Fab oder F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten oder durch Bindung an Schwefelatome des Antikörpers bzw. der Antikörper-Fragmente erfolgen.

Im ersten Fall muß zunächst eine oxidative Spaltung von Zuckereinheiten zur Generation koppelungsfähiger Formylgruppen durchgeführt werden. Diese Oxidation kann auf chemischem Wege mit Oxidationsmitteln wie z.B. Perjodsäure, Natriummetaperjodat oder Kaliummetaperjodat nach literaturbekannten Methoden (zum Beispiel J. Histochem and Cytochem. 22, 1084, 1974) in wässriger Lösung in Konzentrationen von 1 bis 100, vorzugsweise 1 bis 20 mg/ml, und einer Konzentration des Oxidationsmittels zwischen 0,001 bis 10 mMol, vorzugsweise 1 bis 10 mMol, in einem pH-Bereich von ca. 4 bis 8 bei einer Temperatur zwischen 0 bis 37 °C und einer Reaktionsdauer zwischen 15 Minuten und 24 Stunden vorgenommen werden. Auch auf enzymatischem Wege kann die Oxydation, beispielsweise mit Hilfe von Galaktoseoxidase, in einer Enzymkonzentration von 10 - 100 Einheiten/ml, einer Substratkonzentration von 1 bis 20 mg/ml, bei einem pH-Wert von 5 bis 8, einer Reaktionsdauer von 1 bis 8 Stunden und einer Temperatur zwischen 20 und 40 °C, durchgeführt werden (zum Beispiel J. Biol. Chem. 234, 445, 1959).

An die durch Oxidation gegebenen Aldehyde werden Mikropartikel mit geeigneten funktionellen Gruppen, wie zum Beispiel Hydrazin, Hydrazid, Hydroxylamin, Phenylhydrazin, Semicarbazid und Thiosemicarbazid, durch Reaktion zwischen 0 - 37 °C, bei einer Reaktionsdauer von 1 bis 65 Stunden, einem pH-Wert zwischen ca. 5,5 und 8, einer Antikörperkonzentration von 0,5 bis 20 mg/ml und einem molaren Verhältnis des Komplexbildners zum Antikörperaldehyden von 1:1 bis 1000:1 gebunden. Die anschließende Stabilisierung des Konjugats erfolgt durch Reduktion der Doppelbindung, z.B. mit Natriumborhydrid oder Natriumcyanoborhydrid; das Reduktionsmittel wird dabei in einem 10 bis 100fachen Überschuß verwendet (zum Beispiel J. Biol. Chem. 254, 4359, 1979).

Die zweite Möglichkeit der Bildung von Antikörper-Konjugaten geht aus von einer schonenden Reduktion der Disulfid-Brücken des Immunoglobulin-Moleküls; hierbei werden die empfindlicheren Disulfid-Brücken zwischen den H-Ketten des Antikörper-Moleküls gespalten, während die S-S-Bindungen der Antigenbindenden Region intakt bleiben, so daß praktisch keine Verminderung der Bindungsaffinität und -spezifität des Antikörpers eintritt (Biochem. 18, 2226, 1979, Handbook of Experimental Immunology, Vol. 1, Second Edition, Blackwell Scientific Publications, London 1973, Chapter 10). Diese freien Sulfhydryl-Gruppen der interH-Ketten Regionen werden dann mit geeigneten funktionellen Gruppen der Mikropartikel bei 0 bis 37 °C, einem pH-Wert von ca. 4 bis 7, und einer Reaktionsdauer von 3 bis 72 Stunden unter Ausbildung einer kovalenten Bindung, die die Antigen-Bindungsregion des Antikörpers nicht beeinflusst, umgesetzt. Als geeignete reaktive Gruppen seien beispielsweise genannt: Halogenalkyl-, Halogenacetyl-, p-Mercuribenzoat-, Isothiocyanat-, Thiol-, Epoxidgruppen sowie Gruppen, die einer Michael-Additions-Reaktion, wie zum Beispiel Maleimide, Methacrylogruppen (zum Beispiel J. Amer. Chem. Soc. 101, 3097, 1979), zu unterwerfen sind.

Zur Verknüpfung der Antikörperfragmente mit den Mikropartikeln gibt es zusätzlich eine Reihe geeigneter, oft auch kommerziell erhältlicher bifunktioneller "Linker" (siehe zum Beispiel Pierce, Handbook and General Catalogue 1986), die sowohl gegenüber den SH-Gruppen der Fragmente als auch gegenüber den Amino- bzw. Hydrazinogruppen der Mikropartikel reaktiv sind. Als Beispiele seien genannt:

m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS),  
m-Maleimidobenzoyl-N-sulfosuccinimidester (Sulfo-MBS),  
N-Succinimidyl-[4-(iodacetyl)-amino]-benzoesäureester (SIAB),



Succinimidyl-4(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carbonsäureester (SMCC),  
 Succinimidyl-4(p-maleimidophenyl)-buttersäureester (SMPB),  
 N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionsäureester (SDPD),  
 4-[3-(2,5-Dioxo-3-pyrrolinyl)-propionyloxy]-3-oxo-2,5-diphenyl-2,3-dihydrothiophen-1,1-dioxid,  
 Acetylalanylleucylalanylaminopbenzyl,  
 Acetamido-p-thioureidobenzyl.

Es können auch Bindungen nicht-kovalenter Art zur Kopplung an das Bio- oder Makromolekül genutzt werden, wobei sowohl ionische als auch van der Waals- und Wasserstoffbrücken-Bindungen in wechselnden Anteilen und Stärke (Schlüssel-Schloß-Prinzip) zur Bindung beitragen können (zum Beispiel Avidin-Biotin, Antikörper-Antigen). Auch Einschlußverbindungen (host-guest) kleinerer Komplexe in größere Cavitäten beim Makromolekül sind möglich.

Das Kopplungsprinzip besteht darin, zunächst ein bifunktionelles Makromolekül herzustellen, indem man entweder ein gegen ein Tumorantigen gerichtetes Antikörper-Hybridom mit einem gegen die erfindungsgemäßen Mikropartikel gerichtetes zweiten Antikörper-Hybridom fusioniert oder die beiden Antikörper chemisch über einen Linker (beispielsweise in der im J. Amer. Chem. Soc. 101, 3097 (1979) angegebenen Weise) miteinander verknüpft oder den gegen das Tumorantigen gerichteten Antikörper, gegebenenfalls über einen Linker, an Avidin (bzw. Biotin) bindet [D.J. Hnatowich et al., J. Nucl. Med. 28, 1294 (1987)]. Anstelle der Antikörper können auch ihre entsprechenden F-(ab)- bzw. F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente verwendet werden. Für die pharmazeutische Anwendung injiziert man zunächst das bifunktionelle Makromolekül, das sich am Zielort anreichert, und dann im zeitlichen Abstand die erfindungsgemäßen Mikropartikel [gegebenenfalls an Biotin (bzw. Avidin) gebunden], die in-vivo am Zielort angekoppelt werden und dort ihre diagnostische oder therapeutische Wirkung entfalten können. Darüberhinaus können auch andere Kopplungsmethoden wie beispielsweise das in Protein Tailoring Food Med. Uses [Am. Chem. Soc. Symp.] (1985), 349, beschriebene "Reversible Radiolabeling" zur Anwendung kommen.

Mit der sogenannten Festphasen-Kopplung steht eine besonders einfache Methode zur Herstellung von Antikörper-Konjugaten bzw. Antikörperfragment-Konjugaten zur Verfügung: Der Antikörper wird an eine stationäre Phase (z.B. einen Ionenaustauscher), der sich zum Beispiel in einer Glassäule befindet, gekoppelt. Durch sukzessives Spülen der Säule mit einer zur Gewinnung von Aldehyd-Gruppen geeigneten Lösung, Waschen, Spülen mit einer Lösung der funktionalisierten Mikropartikel, Waschen und schließlich Eluieren

des Konjugats werden sehr hohe Konjugat-Ausbeuten erhalten.

Dieses Verfahren erlaubt die automatische und kontinuierliche Produktion beliebiger Mengen an Konjugaten.

Auch andere Kopplungsschritte können auf diese Art und Weise durchgeführt werden.

So können zum Beispiel durch die Sequenz Papain-Reduktion/bifunktionaler Linker/funktionalisierte Mikropartikel Fragment-Konjugate hergestellt werden.

Die so gebildeten Verbindungen werden anschließend vorzugsweise chromatographisch gereinigt.

Es lassen sich Partikel in der Größe von 0,04 - 100 µm, vorzugsweise 0,1 - 40 µm, herstellen. Die Größe der Partikel läßt sich im wesentlichen beeinflussen durch Variation der Ausgangskonzentration von Monomer, Tensid und pH-Wert.

Beispiele für die Herstellung von Partikeln bestimmter Größe:

1.)

Acroleinkonzentration:

10 % (W/V)

Tensidkonzentration:

1,5 % (W/V)

pH-Wert:

10,0

Temperatur:

4 °C

Werden diese Bedingungen gewählt, so erhält man Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 750 nm.

2.)

Acroleinkonzentration:

20 % (W/V)

Tensidkonzentration:

0,2 % (W/V)

pH-Wert:

10,0

Temperatur:

2 °C

Unter diesen Bedingungen erhält man Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 40 µm.

3.) Bei gleichen Bedingungen wie unter 2.) aufgeführt, jedoch bei einer Acroleinkonzentration von 10 % (W/V) erhält man Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 8 µm.

4.)

Acroleinkonzentration:

10 % (W/V)

Tensidkonzentration:

0,5 % (W/V)

pH-Wert:

11,0

Mittlerer Partikeldurchmesser:

560 nm

5.) Unter gleichen Bedingungen wie unter 4.),

nur bei einem pH-Wert von 9 ergibt sich eine mittlere Partikelgröße von 3,2  $\mu\text{m}$ .

Als Tensid wird Polyglutaraldehydnatriumhydrogensulfit-Addukt (PGL) verwendet.

Anstelle des Polyglutaraldehydnatriumhydrogensulfit-Addukts (PGL) kann auch Polyacroleinnatriumhydrogensulfit-Addukt (PAC-SO<sub>3</sub>) eingesetzt werden, ohne daß ein Einfluß auf die Partikelgröße zu beobachten ist.

#### Synthese von PGL:

Eine 25 % wäßrige Lösung von Glutaraldehyd wird über Aktivkohle gereinigt. Anschließend wird durch die Einleitung von N<sub>2</sub> in die wäßrige Lösung die Lösung von O<sub>2</sub> befreit. Ferner wird eine Pufferlösung (Phosphatpuffer, 1 molar) auf pH = 11 eingestellt. Die Pufferlösung wird auch von O<sub>2</sub> durch Einleitung von N<sub>2</sub> befreit. Die Pufferlösung und Glutaraldehydlösung werden zusammengebracht und unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre 72 Stunden lang polymerisiert. Danach wird das Polymerisat filtriert und mit Aceton und Wasser gewaschen. Das gewaschene Polymerisat wird im Vakuumtrockenschrank bei 45 °C getrocknet. In 30 ml H<sub>2</sub>O, das 12,5 g NaHSO<sub>3</sub> enthält, werden 5 g Polyglutaraldehyd gelöst. Die Lösung wird mit destilliertem H<sub>2</sub>O dialysiert. Anschließend wird die Lösung lyophilisiert.

Die erfindungsgemäßen Partikel lassen sich in wäßrigen Lösungen suspendieren, ohne daß es zu Aggregation der Teilchen kommt. Zur Herstellung einer galenischen Formulierung, die parenteral applizierbar ist, lassen sich wäßrige Lösungen verwenden, die isotonisierende Zusätze wie Natriumchlorid, Zuckeralkohole (Mannit, Sorbit, Xylit etc.) oder Zucker (Glucose, Fructose) enthalten. Zur Einstellung des pH-Wertes können Puffer wie Trometamol/HCl, Citronensäure/NaOH etc. gewählt werden.

#### Synthese von PAC-SO<sub>3</sub>:

A. In einem Dreihalskolben versehen mit Tropftrichter und Rührer werden 100 ml destilliertes Wasser gegeben und durch Einleiten von Stickstoff von Sauerstoff befreit. Danach werden 1,829 g K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> zu diesem Wasser gegeben und gelöst. Nachdem sich K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> vollständig aufgelöst hat, wird zu dieser Lösung 20 ml frisch destilliertes Acrolein gegeben. Danach wird 1,14 g AgNO<sub>3</sub> gelöst in 5 ml Wasser zugegeben und unter Rühren 2 Stunden lang polymerisiert. Das ausgefallene Polymerisat wird abfiltriert, mehrfach mit Wasser gewaschen und anschließend wird zur Entfernung der Silberionen 1 l Wasser, in dem 1,63 g Natriumthiosulfat gelöst sind, 1 Stunde lang resuspendiert. Das

Polymerisat wird abfiltriert und im Vakuumtrockenschrank bei 45 °C getrocknet. Das getrocknete Polymerisat wird in einem Mörser grob zerkleinert. 10 g zerkleinertes Polymerisat werden in 100 ml Natriumhydrogensulfit (37 %) gelöst. Danach wird die Lösung gegen destilliertes Wasser dialysiert (cut off 5000 d). Das Dialysat wird als Tensid für die Herstellung der Polyacrolein-Mikropartikel eingesetzt.

B. In einem Rundkolben werden 100 ml destilliertes Wasser vorgelegt. Unter Rühren wird 20 ml frisch destilliertes Acrolein zugegeben. Anschließend wird durch Zugabe von NaOH-Lösung (2 N) der pH des Reaktionsgemischs auf 10,5 eingestellt und dies unter Rühren 2 Stunden lang polymerisiert. Das ausgefallene Polymerisat wird abfiltriert, mehrmals mit Wasser gewaschen und im Vakuumtrockenschrank bei 45 °C getrocknet. 10 g Polymerisat werden in 100 ml NaHSO<sub>3</sub>-Lösung (37 %) gelöst. Die Lösung wird gegen bidestilliertes Wasser dialysiert (cut off 5000 d). Der Rückstand wird als Tensid bei der Herstellung der Polyacrolein-Mikropartikel verwendet.

#### Beispiele

1.) In 100 ml einer Formulierung sind enthalten:

Partikel:  
100 mg  
Trometamol:  
2.4 mg  
+ HCL für pH = 7,4  
Mannit:  
5500 mg  
Wasser:  
ad 100 ml

2.) In 100 ml einer Formulierung sind enthalten:

Partikel:  
50 mg  
Natriumchlorid:  
860 mg  
Wasser  
ad 100 ml

Ein Aufschwimmen der Partikel kann dadurch verhindert werden, daß die mittlere Dichte des Partikels an die des umgebenden Vehikels angeglichen wird.

Dies kann durch Zusätze von Substanzen höherer Dichte (Röntgenkontrastmittel, Magnetite) erreicht werden. Diese Möglichkeit bietet sich besonders bei Partikeln mit geringem Polyaldehydgehalt an.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel enthalten 0,1  $\mu\text{g}$  - 100 mg Mikropartikel/ml, vorzugsweise 10  $\mu\text{g}$  - 1 mg Mikropartikel/ml galenischer Formulierung und werden in der Regel in Dosen von 0,01 ml - 10 ml/kg, vorzugsweise 0,1 - 1 ml/kg Körpergewicht, dosiert. Sie sind zur ent ra-

len und parenteralen Applikation bestimmt.

Zur Verwendung in der Hyperthermie-Therapie werden die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel in der Regel in Mengen von 0,001 - 10 mg, vorzugsweise 0,01 - 1 mg pro g Tumor eingesetzt.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung erläutern, ohne sie auf diese zu beschränken.

#### Methoden zur Herstellung des Kontrastmittels

##### 1. Reaktionsstufe:

A) Eine tensidhaltige (0,01 - 5 % w/v) wäßrige Lösung wird unter Rührung auf 0 °C abgekühlt. Dabei wird ein Gas in die Lösung eingeleitet. Der pH-Wert der Lösung wird mit NaOH auf den gewünschten pH-Wert (vorzugsweise 9 - 13) eingestellt. Zu dieser Lösung wird das Monomer bzw. Monomergemisch gegeben. Nach 30 Minuten wird die Rührgeschwindigkeit reduziert. Nach 1 Stunde wird das Reaktionsgemisch mit der oben angegebenen tensidhaltigen wäßrigen Lösung verdünnt. Die Rührgeschwindigkeit wird noch weiter gesenkt. Nach 4 Stunden werden die ausgefallenen nicht-gasenthaltenden Mikropartikel von der übrigen Suspension dekantiert und verworfen. Die dekantierte Suspension wird dialysiert, um das Kontrastmittel von Restmonomeren zu reinigen.

Ausbeute: 80 - 90 %

B) Eine wäßrige Lösung, welche die gewünschte Tensid- und Monomermenge enthält, wird auf 0 °C abgekühlt. Dabei wird das gewünschte Gas unter Rühren durch die Lösung eingeleitet. Anschließend wird mit NaOH der pH-Wert der Lösung auf vorzugsweise 9 - 13 eingestellt. Nach 1 Stunde wird das Reaktionsgemisch verdünnt. Nach 3 - 4 Stunden wird die Mikropartikel enthaltende Suspension von dem ausgefallenen Polymerisat, das verworfen wird, getrennt. Die Suspension wird durch Dialyse gereinigt.

Ausbeute: 80 - 90 %

##### Beispiel 1

Es werden 91 ml 0,5 %ige wäßrige Tensidlösung in einen Kolben gegeben. Der pH-Wert der Lösung wird mit 0,2 N NaOH-Lösung auf 11 eingestellt. Durch die Lösung wird N<sub>2</sub> eingeleitet. Zu der auf 0 °C abgekühlten 0,5 %igen Tensidlösung wird 9,5 ml frisch destilliertes Acrolein getropft. Nach 1 Stunde werden zum Reaktionsgemisch weitere 100 ml 0,5 %ige Tensidlösung gegeben. Nach 3 Stunden wird die Mikropartikel enthaltende Suspension von den ausgefallenen Polymeren dekantiert und durch Dialyse gereinigt.

##### Beispiel 2

Es werden 82 ml 0,08 %ige wäßrige Tensidlösung

in einen Kolben gegeben. Die Lösung wird auf 0 °C abgekühlt. Zu der abgekühlten Lösung werden 18 ml frisch destilliertes Acrolein zugegeben. In die Lösung wird unter Rühren Argon eingeleitet. Nach 1 Stunde wird der pH-Wert der Lösung mit einer 0,2 N NaOH-Lösung auf 12 eingestellt. Nach 2 Stunden werden 100 ml 0,08 %ige Tensidlösung zugegeben. Nach 3 Stunden wird die Suspension dekantiert und dialysiert.

##### Beispiel 3

Es werden 70 ml 0,08 %ige wäßrige Tensidlösung, die 10 % Dimethylformamid enthält, in einen Kolben gegeben. Der pH-Wert der Lösung wird mit 0,2 N NaOH-Lösung auf 11,5 eingestellt. Die Lösung wird auf 0 °C abgekühlt. Dabei wird N<sub>2</sub> in die Lösung eingeleitet. In diese Lösung werden 30 ml frisch destilliertes Acrolein getropft. Nach 1 Stunde wird der Lösung 100 ml 0,08 %ige Tensidlösung zugegeben. Nach 4 Stunden wird die Suspension von den ausgefallenen Polymeren getrennt und gereinigt.

##### Beispiel 4

Es werden 91 ml 0,5 %ige wäßrige Tensidlösung, die 5 % Magnetit enthält, in einem Kolben auf 0 °C abgekühlt. Der pH-Wert der Lösung wird mit 0,2 N NaOH auf 12 eingestellt. Durch die Lösung wird N<sub>2</sub> eingeleitet. Zu der auf 0 °C abgekühlten Lösung werden 9 ml frisch destilliertes Acrolein zugetropft. Nach 1 Stunde werden dem Reaktionsgemisch 100 ml der 0,5 %igen Tensidlösung zugegeben. Die Mikropartikel enthaltende Suspension wird durch Dekantieren von ausgefallenen Polymeren getrennt und dialysiert.

##### Beispiel 5

Es werden 91 ml 0,5 %ige Tensidlösung in einen Kolben gegeben. Der pH-Wert der Lösung wird durch Zugabe von 0,2 N NaOH-Lösung auf 12 eingestellt. Die Lösung wird auf 0 °C abgekühlt. Durch die Lösung wird Argon eingeleitet. Zu dieser Lösung werden 9 ml frisch destilliertes Acrolein, welches 5 % Butylcyanoacrylat enthält, zugetropft. Nach 1 Stunde werden weitere 100 ml der 0,5 %igen Tensidlösung zugegeben. Die Suspension wird vom Bodensatz getrennt und gereinigt.

##### Beispiel 6

Es werden 91 ml 0,08 %ige wäßrige Tensidlösung in einen Kolben gegeben. Der pH-Wert der Lösung wird durch Zugabe von 0,2 N NaOH-Lösung auf 10,5 eingestellt. Die Lösung wird auf 0 °C abgekühlt. Durch die Lösung wird N<sub>2</sub> eingeleitet.

tet. Zu dieser Lösung werden 9 ml frisch destilliertes Acrolein, welches 20 %  $\alpha$ -Methylacrolein enthält, zugetropft. Nach 1 Stunde werden weitere 100 ml der 0,08 %igen Tensidlösung zugegeben. Nach 2 Stunden wird die Mikrosphären-Suspension vom Bodensatz getrennt und gereinigt.

#### Beispiel 7

Es werden 91 ml 0,08 %ige wäßrige Tensidlösung, welche 25 % Isopentan enthält, in einen Kolben gegeben. Die Lösung wird auf 0 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung werden 9 ml frisch destilliertes Acrolein unter Rühren zugegeben. Nach 2 Stunden wird das Reaktionsgemisch filtriert. Die Mikropartikel werden durch Waschen mit Wasser gereinigt. Die Mikrosphären werden in Wasser resuspendiert.

Tensidlösung:  
Polyglutaraldehydnatriumhydrogensulfit-Addukt.

#### 2. Reaktionsstufe

Eine Suspension von Polyacrolein-Mikropartikeln in destilliertem Wasser wird durch Zugabe von 0,01 N HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. Zu dieser Suspension wird unter Rühren bei Raumtemperatur ein Überschuß des aminhaltigen Liganden gegeben. Der pH-Wert dieser Lösung wird zuvor durch Zugabe von 0,01 N NaOH-Lösung auf 8 eingestellt.

Im Anschluß rührt man in Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit bis zu 48 Stunden bei Raumtemperatur. Zur Entfernung des überschüssigen aminhaltigen Liganden wird gegen Wasser dialysiert.

Gegebenenfalls werden die gebildeten Schiffschen Basen durch Zugabe von Reduktionsmitteln zu den Aminen reduziert.

#### Beispiel 6

1000 mg Polyacrolein-Mikropartikel aus Beispiel 1 werden in 50 ml Wasser resuspendiert. Zu dieser Suspension werden 1000 mg 3-Aminopropan-1-sulfonsäure zugegeben und 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Suspension gegen Wasser dialysiert.

Dann wird mit 150 mg  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  versetzt und bei pH 7,5 24 Stunden gerührt. Diese Suspension wird anschließend gegen Wasser dialysiert.

Gegebenenfalls kann das Amin alkyliert oder mit Chloressigsäure, Acetanhydrid oder Diglycolsäureanhydrid acetyliert werden.

#### Beispiel 9

1000 mg Polyacrolein-Mikropartikel 1 aus Beispiel 2 werden in 50 ml Wasser resuspendiert. Zu dieser Suspension werden 1000 mg 3-Aminopropanphosphat zugegeben und 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Suspension gegen Wasser dialysiert.

Dann wird mit 150 mg  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  versetzt und bei pH 7,5 24 Stunden gerührt. Diese Suspension wird anschließend gegen Wasser dialysiert.

Gegebenenfalls kann das Amin alkyliert oder mit Chloressigsäure, Acetanhydrid oder Diglycolsäureanhydrid acetyliert werden.

#### Beispiel 10

1000 mg Polyacrolein-Mikropartikel aus Beispiel 3 werden in 50 ml Wasser resuspendiert. Zu dieser Suspension werden 1000 mg 8-Aminooctansäure zugegeben und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Suspension gegen Wasser dialysiert.

Dann wird mit 150 mg  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  versetzt und bei pH 7,5 24 Stunden gerührt. Diese Suspension wird anschließend gegen Wasser dialysiert.

Gegebenenfalls kann das Amin alkyliert oder mit Chloressigsäure, Acetanhydrid oder Diglycolsäureanhydrid acetyliert werden.

#### Beispiel 11

1000 mg Polyacrolein-Mikropartikel aus Beispiel 4 werden in 50 ml Wasser resuspendiert. Zu dieser Suspension werden 1000 mg 5-Aminovaleriansäure zugegeben und 36 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Suspension gegen Wasser dialysiert.

Dann wird mit 150 mg  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  versetzt und bei pH 7,5 24 Stunden gerührt. Diese Suspension wird anschließend gegen Wasser dialysiert.

Gegebenenfalls kann das Amin alkyliert oder mit Chloressigsäure, Acetanhydrid oder Diglycolsäureanhydrid acetyliert werden.

#### Beispiel 12

1000 mg Polyacrolein-Mikropartikel aus Beispiel 5 werden in 50 ml Wasser resuspendiert. Zu dieser Suspension werden 1000 mg D-Glucoseaminhydrochlorid zugegeben und 30 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Suspension gegen Wasser dialysiert.

Dann wird mit 150 mg  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  versetzt und bei pH 7,5 24 Stunden gerührt. Diese Suspension wird anschließend gegen Wasser dialysiert.

Gegebenenfalls kann das Amin alkyliert oder mit Chloressigsäure, Acetanhydrid oder Diglycolsäureanhydrid acetyliert werden.

**Beispiel 13**

1000 mg Polyacrolein-Mikropartikel aus Beispiel 6 werden in 50 ml Wasser resuspendiert. Zu dieser Suspension werden 1000 mg Hexamethylen-diamin zugegeben und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Suspension gegen Wasser dialysiert.

Dann wird mit 150 mg  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  versetzt und bei pH 7,5 24 Stunden gerührt. Diese Suspension wird anschließend gegen Wasser dialysiert.

Gegebenenfalls kann das Amin alkyliert oder mit Chloressigsäure, Acetanhydrid oder Diglycol-säureanhydrid acetyliert werden.

**Beispiel 14**

1000 mg Polyacrolein-Mikropartikel aus Beispiel 7 werden in 50 ml Wasser resuspendiert. Zu dieser Suspension werden 1000 mg Polylysin (MG = 32.600 Dalton) zugegeben und 30 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Suspension mit Wasser gewaschen.

**Beispiel 15**

100 mg Polyacrolein-Mikropartikel aus Beispiel 5 werden in 2,5 ml Wasser resuspendiert. Zu dieser Suspension werden 250 mg in 2,5 ml Wasser gelöstes Humanserumalbumin gegeben und 8 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Suspension gegen destilliertes Wasser dialysiert (cut off 100.000).

**Beispiel 16**

1000 mg Polyacrolein-Mikropartikel aus Beispiel 4 werden in 50 ml Wasser resuspendiert. Zu dieser Suspension werden 1000 mg (2-Diethylamino)-ethylamin gegeben und 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Suspension gegen Wasser dialysiert.

**Beispiel 17**

300 mg Polyacrolein-Mikropartikel aus Beispiel 1 werden in 7,5 ml destilliertem Wasser suspendiert. Zu dieser Suspension werden 750 mg in 7,5 ml Wasser gelöste 3-Aminopropan-1-sulfonsäure gegeben und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Suspension gegen destilliertes Wasser dialysiert (cut off 1000 d).

**Beispiel 18**

200 mg Polyacrolein-Mikropartikel aus Beispiel 7 werden in 5 ml destilliertem Wasser resuspendiert. Zu dieser Suspension werden 500 mg in 5 ml

Wasser gelöstes Lysin gegeben und 24 Stunden bei Raumtemperatur g rührt. Danach wird die Suspension gegen destilliertes Wasser dialysiert (cut off 5000 d).

**In-vitro-Versuche**

In in-vitro-Experimenten werden durch Rückstreuungsmessungen der Echoamplitude von Suspensionen beispielhaft ausgewählter erfindungsgemäßer Mikropartikel deren sehr gute akustische Eigenschaften belegt.

Zur Erklärung der in-vitro-Versuche und der daraus gewonnenen Abbildungen:

Die Meßapparatur besteht aus einem Ultraschallsender kombiniert mit einem Ultraschallempfänger und einer Meßküvette mit der Probe. Zur Messung der akustischen Eigenschaften der Probe wird ein Ultraschallimpuls ausgesendet. Der Impuls wird an der Glaswand der Küvette gestreut, durchläuft die Probe und wird dann, falls die Probe nicht echogen ist, an der Rückseite der Küvette gestreut. Die Rückstreuung des Ultraschallimpulses wird vom Empfänger gemessen und durch eine Änderung der Amplitude (siehe Abbildungen) angezeigt.

In Abb. 1 ist das Rückstreuverhalten von Wasser (als Beispiel für eine nicht echogene Probe) dargestellt. Es ist deutlich die Rückstreuamplitude der Vorderwand (bei 3  $\mu\text{sec}$ ) und der Rückwand (bei ca. 16  $\mu\text{sec}$ ) der Küvette erkennbar.

Wird eine echogene Probe vermessen, so ergibt sich ein Rückstreuverhalten wie es in den Abb. 2 - 4 wiedergegeben ist. Das Rückstreusignal der Küvettenwand wird nicht erhalten, da der Ultraschallimpuls durch Wechselwirkung mit der echogenen Probe dissipiert bzw. so verändert wird, daß keine Rückstreuung mehr zum Empfänger erfolgen kann.

Es wurden die Rückstreuamplituden von wäßrigen Partikelsuspensionen der Beispiele 8 (Abb. 2), 11 (Abb. 3) und 15 (Abb. 4), jeweils in einer Konzentration von 0,5 mg/ml, bestimmt.

**In-vivo-Versuche**

Zur Durchführung einer echokardiographischen Untersuchung bei einem ca. 10 kg schweren Hund (Beagle) werden die erfindungsgemäßen Kontrastmittel folgenderweise verwendet: Aus dem Vial mit der gebrauchsfertigen Suspension wird 1 ml der Lösung entnommen, die 40  $\mu\text{g/ml}$  mit Albumin gekoppelte Partikel (Beispiel 15) in 5 % Glukoselösung enthält. Die Injektion dieses Kontrastmittels erfolgt in die Vena saphena ramus caudalis über einen allseitig offenen Dreivegehahn mit einer Injektionsgeschwindigkeit von mindestens 1 ml/s, günstiger jedoch mit einer Geschwindigkeit von 3 ml/s, gefolgt von einer Nachinjektion von 5 ml einer

physiologischen Kochsalzlösung (0,9 %ig). Di Nachinjektion erfolgt, um einen möglichst lange bestehenbleibenden Kontrastmittelbolus zu erhalten. Vor der Injektion (Abb. 5) wird ein "apikaler Vierkammerblick" bei dem Versuchstier mit einem handelsüblichen Schallkopf für die Echokardiographie an der Thoraxwand (transthorakale Ableitung) eingestellt und mit einer Klammer fixiert. Vor, während und nach der Injektion wird die Schallableitung auf dem Bildschirm des Ultraschall-Untersuchungsgerätes angezeigt und ggf. auf Videoband oder mit einem Videoprinter dokumentiert. Diese Versuchsanordnung entspricht dem Stand der Technik und ist dem Fachmann bekannt.

Bei Erreichen des Ultraschall-Kontrastmittels im rechten Herz lassen sich die Kontrasteffekte im Farbdoppler, im 2D-Echobild oder im M-Mode Echobild verfolgen. Das Kontrastmittel markiert zuerst das Blut des rechten Vorhofes, dann wird der rechte Ventrikel und schließlich die Pulmonalarterie kontrastiert. Hierbei tritt eine homogene Füllung auf, die für eine diagnostische Untersuchung ausreichende Zeit anhält. Während die Höhlen des rechten Herzens sich wieder mit nicht kontrastiertem Blut füllen (Abnahme und Verschwinden der Echogenität in den Herzhöhlen) erscheint das Kontrastmittel nach der Lungenpassage (transkapillär) in den Pulmonalvenen, füllt dann den linken Vorhof, den linken Ventrikel und das nachfolgende Hochdrucksystem homogen. Die Kontrasteffekte in den Höhlen des linken Herzens halten länger an als die auf der rechten Herzseite. Neben der Kontrastierung der Höhlen des linken Herzens erfolgt auch eine Kontrastierung anderer Organe, die die Durchblutung widerspiegelt.

Abbildung 6 zeigt die Füllung des linken Ventrikels mit Kontrastmittel.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Ultraschall-Kontrastmittel beschränkt sich nicht auf die Sichtbarmachung der Blutströme im Gefäßsystem, eine Kontrastierung von Körperhöhlen ist ebenso möglich. Bedingt durch die Durchblutungs-darstellung kann auch mit gutem Erfolg die Untersuchung anderer Organe mit diesen Kontrastmitteln erfolgen.

#### Patentansprüche

1. Mikropartikel bestehend aus bioabbaubaren Polymeren, dadurch gekennzeichnet, daß sie aufgebaut sind aus polymerisierbaren Aldehyden, die gewünschtenfalls zur Copolymerisation fähige Zusätze und/oder Crosslinker enthalten, gegebenenfalls Tensiden oder Tensidgemischen, Gasen und/oder leichtflüchtigen Flüssigkeiten in freier oder gebundener Form, Kopplungsagentien, gegebenenfalls über die Kopplungsagentien gebundenen Bio- oder Ma-

kromolekülen sowie gegebenenfalls diagnostisch oder therapeutisch wirksamen Bestandteilen.

2. Pharmazeutische Mittel, dadurch gekennzeichnet, daß sie Mikropartikel nach Anspruch 1 sowie gegebenenfalls in der Galenik übliche Zusätze enthalten.

3. Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie in der Ultraschalldiagnostik angewendet werden.

4. Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie in der künstlichen partiellen Hyperthermie angewendet werden.

5. Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch ein äußeres Magnetfeld gelenkt werden können.

6. Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die polymerisierbaren Aldehyde ausgewählt werden aus:

- I.  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigten Aldehyden, wie zum Beispiel

Acrolein

Crotonaldehyd

Propionaldehyd

II.  $\alpha$ -substituierten Acroleinderivaten, wie zum Beispiel

$\alpha$ -Methylacrolein

$\alpha$ -Chloroacrolein

$\alpha$ -Phenylacrolein

$\alpha$ -Ethylacrolein

$\alpha$ -Isopropylacrolein

$\alpha$ -n-Butylacrolein

$\alpha$ -n-Propylacrolein

III. Dialdehyden, wie zum Beispiel

Glutaraldehyd, Succinaldehyd oder deren Derivate oder deren Mischungen mit zur Copolymerisation fähigen Zusätzen, wie zum Beispiel:

$\alpha$ -substituierten Acroleinen

$\beta$ -substituierten Acroleinen

Ethylcyanacrylaten

Methylcyanacrylaten

Butylcyanacrylaten

Hexylcyanacrylaten

Methylmetacrylaten

Vinylalkoholen

Acrylsäuren

Methacrylsäuren

Acrylsäurechloriden

Methacrylsäurechloriden		Propan	
Acrylnitril		Butan	
Methacrylnitrilen		Pentan	
Acrylamiden		Neopentan	
Substituierten Acrylamiden	5	Isopentan	
Hydroxymethylmethacrylaten		Cyclopentan	
Mesityloxid		Ethylen	
Dimethylaminoethylmethacrylaten-2-		Propylen	
Vinylpyridinen		Acetylen	
N-vinyl-2-Pyrrolidinon	10	3,3-Dimethyl-1-Butin	
7. Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die gegebenenfalls enthaltenen Tenside ausgewählt werden aus ionogenen oder nicht-ionogenen oberflächenaktiven Substanzen (Tensiden) wie zum Beispiel:	15	2,3-Pentadien	
		2-Methyl-2-Buten	
		2-Methyl-1,3-Butadien	
		2-Butin	
		2-Methyl-1-Buten	
		3-Methyl-1-Buten,	
Polyethylenoxid		halogenierte Kohlenwasserstoffe oder Gemische, wie zum Beispiel:	
Polyoxyethylenpolyoxypropylenen wie	20	Methylenchlorid	
Pluronic <sup>(R)</sup> F 68, Pluronic <sup>(R)</sup> F 108, Pluronic <sup>(R)</sup> F 127,		1,1-Dichlorethylen	
Polyethylenglykol, Poloxamin 908, Polaxamer 407	25	Isopropylchlorid	
		Dibromdifluormethan	
		Brommethan,	
Carbonsäuresalzen, wie zum Beispiel: Natriumoleat		Ether, wie zum Beispiel: Dimethylether, Diethylether oder fluorierte Ether,	
Polyoxyethylenfettsäureestern, wie zum Beispiel:	30	oder Verbindungen wie zum Beispiel:	
Polyoxyethylenstearat		Dimethylaminoaceton	
Natriumdioctylsulfosuccinat		Propylenoxid	
Polyglutaraldehydnatriumhydrogensulfit-Addukt		N-Ethylmethylamin	
Polyacrolein-Natriumhydrogensulfit-Addukt	35	N-Ethyldimethylamin	
Polyvinylsulfonsäure		Furan	
8. Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Gase bzw. leichtflüchtige Flüssigkeiten	40	verwendet werden.	
Ammoniak		9. Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Kopplungsagenzien	
Luft		I. Aminogruppenhaltige Verbindungen, wie zum Beispiel:	
Edelgase (Helium, Neon, Argon, Xenon, Krypton)	45		
Schwefelhalogenide, wie zum Beispiel: Schwefelhexafluorid,		Hydroxylamin	
Stickstoff		Butylamin	
Kohlenstoffoxide	50	Allylamin	
Sauerstoff		Ethanolamin	
Wasserstoff,		Trishydroxymethylaminomethan	
Kohlenwasserstoffe oder deren Gemische, wie zum Beispiel:	55	3-Amino-1-propansulfonsäure	
		5-Aminovaleriansäure	
		$\beta$ -Aminooctansäure	
		D-Glucosaminhydrochlorid	
		Aminogalactose	
		Aminosorbit	
		Aminomannit	
		Diethylaminoethylamin	
		Aniline	
		Sulfonilsäureamid	

Cholin  
N-Methylglucamin  
Piperazin

1,6-H xandiamin

Harnstoff

Hydrazin

Glycin

Alanin

Lysin

Serin

Valin

Leucin

Peptide

Proteine

Albumin

Humanserumalbumin

Polylysin

Gelatine

Polyglykolamine

Aminopolyalkohole

Dextransulfate mit Aminogruppen

N-Aminopolyethylenglycol (HO-PEG-NH<sub>2</sub>)

N,N'-Diaminopolyethylenglycol (NH<sub>2</sub>-PEG-NH<sub>2</sub>)

Antikörper

Immunoglobuline

II. Säuregruppenhaltige Verbindungen, wie  
z.B.: Carbonsäuren

Essigsäure

Propionsäure

Buttersäure

Valeriansäure

Capronsäure

Caprylsäure

Caprinsäure

Laurinsäure

Myristinsäure

Palmitinsäure

Stearinsäure

Ölsäure

Linolsäure

Linolensäure

Cyclohexancarbonsäure

Phenyllessigsäure

Benzoylessigsäure

Chlorbenzoesäure

Brombenzoesäure

Nitrobenzoesäure

Ortho-Phthalsäure

Meta-Phthalsäure

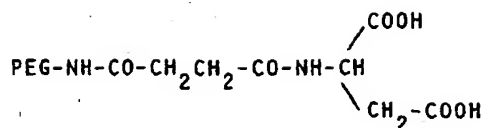
Para-Phthalsäure

Salicylsäure

Hydroxybenzoesäure

Aminobenzoessäure

Methoxybenzoesäure



(PEG-Linker-Asparaginsäure)

PEG-Linker-Glutaminsäure

PEG-Linker-DTPA

PEG-Linker-EDTA

III. Hydroxygruppenhaltige Verbindungen,  
wie z.B.: Alkohole

Methanol

Ethanol

Propanol

Butanol

Pentanol

Hexanol

Heptanol

Octanol

Decanol

Dodecanol

Tetradecanol

Hexadecanol

Octadecanol

Isopropylalkohol

Isobutylalkohol

Isopentylalkohol

Cyclopentanol

Cyclohexanol

Crotylalkohol

Benzylalkohol

Phenylalkohol

Diphenylmethanol

Triphenylmethanol

Zimtalkohol

Ethylenglykol

1,3-Propandiol

Glycerin

Pentaerythrit

IV. Polymerisierfähige Substanzen, wie

$\alpha,\beta$ -ungesättigte Aldehyde, wie z.B.:

Acrolein

Crotonaldehyd

Propinaldehyd

$\alpha$ -substituierte Acroleinderivate, wie z.B.:

$\alpha$ -Methylacrolein

$\alpha$ -Chloroacrolein

$\alpha$ -Phenylacrolein

$\alpha$ -Ethylacrolein

$\alpha$ -Isopropylacrolein

$\alpha$ -n-Butylacrolein



$\alpha$ -n-Propylacrolein  
Dialdehyde, wie z.B.:

Glutaraldehyd, Succinaldehyd oder deren  
Derivate oder deren Mischungen mit zur  
Copolymerisation fähigen Zusätzen, wie  
z.B.:

$\alpha$ -substituierten Acroleinen  
 $\beta$ -substituierten Acroleinen

Ethylcyanacrylaten  
Methylcyanacrylaten  
Butylcyanacrylaten  
Hexylcyanacrylaten  
Methylmetacrylaten  
Vinylalkoholen  
Acrylsäuren  
Methacrylsäuren  
Acrylsäurechloriden

Acrylnitril  
Methacrylnitrilen  
Acrylamiden  
Substituierten Acrylamiden  
Hydroxymethylmethacrylaten  
Mesityloxid  
Dimethylaminoethylmethacrylaten-2-  
Vinylpyridinen  
N-vinyl-2-Pyrrolidinon

verwendet werden.

10. Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch ge-  
kennzeichnet, daß sie als Bio- oder Makromo-  
leküle organ- oder gewebespezifische Verbin-  
dungen, wie zum Beispiel monoklonale Anti-  
körper enthalten.

11. Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch ge-  
kennzeichnet, daß sie diagnostisch oder thera-  
peutisch wirksame Bestandteile zur Diagnose  
und Therapie von Tumoren wie zum Beispiel

Doxorubicin  
Actinomycin  
Magnetit  
Mitomycin C  
Triamcinolon

enthalten.

12. Verfahren zur Herstellung von Mikropartikeln  
nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß man eine 0 bis 40 %, vorzugsweise 0,01  
bis 10 % w/v Tensid(e) und 0 bis 10 % w/v  
diagnostisch oder therapeutisch wirksame Be-  
standteile und Gase oder leichtflüchtige Flüs-  
sigkeiten enthaltende wäßrige Lösung unter

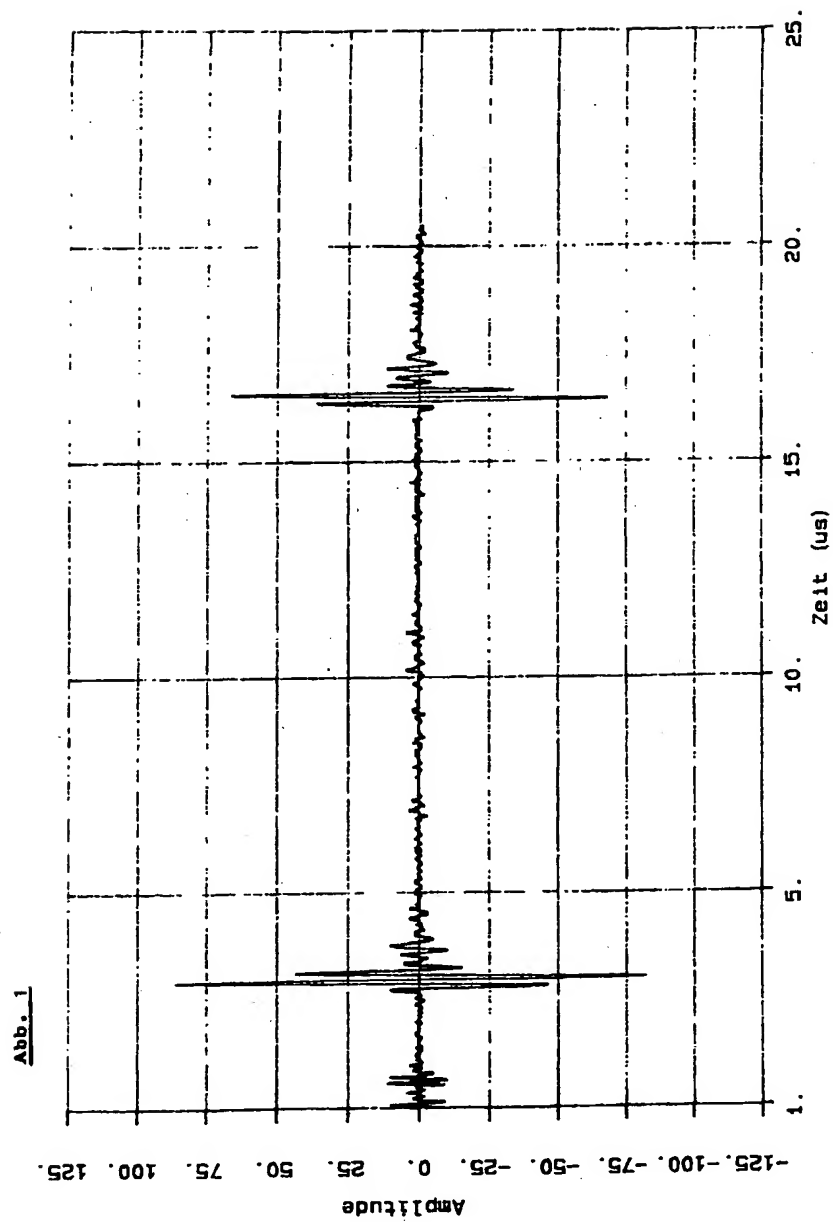
Mischen, bei einer Temperatur von -5° bis  
+80 °C, vorzugsweise 0° bis 40 °C, inem  
pH-Wert von 7 bis 14, vorzugsweise 9 bis 13,  
innerhalb von 1 Minute bis 24 Stunden, vor-  
zugsweise 1 Stunde bis 10 Stunden, und ge-  
gebenenfalls unter Einleiten von Gas mit  
copolymerisierbarem/n Aldehyd(en) bis zu ei-  
ner Konzentration bezogen auf die Reaktions-  
mischung von 0,1 bis 50 %, vorzugsweise 3  
bis 20 % w/v, sowie mit copolymerisierbaren  
Zusätzen einer Konzentration bezogen auf die  
Reaktionslösung von 0 bis 20 %, vorzugsweise  
1 bis 5 % w/v, mit Crosslinker(n) einer Konzen-  
tration bezogen auf die Reaktionsmischung  
von 0 - 5 %, vorzugsweise 0,1 bis 1 % w/v,  
umsetzt,

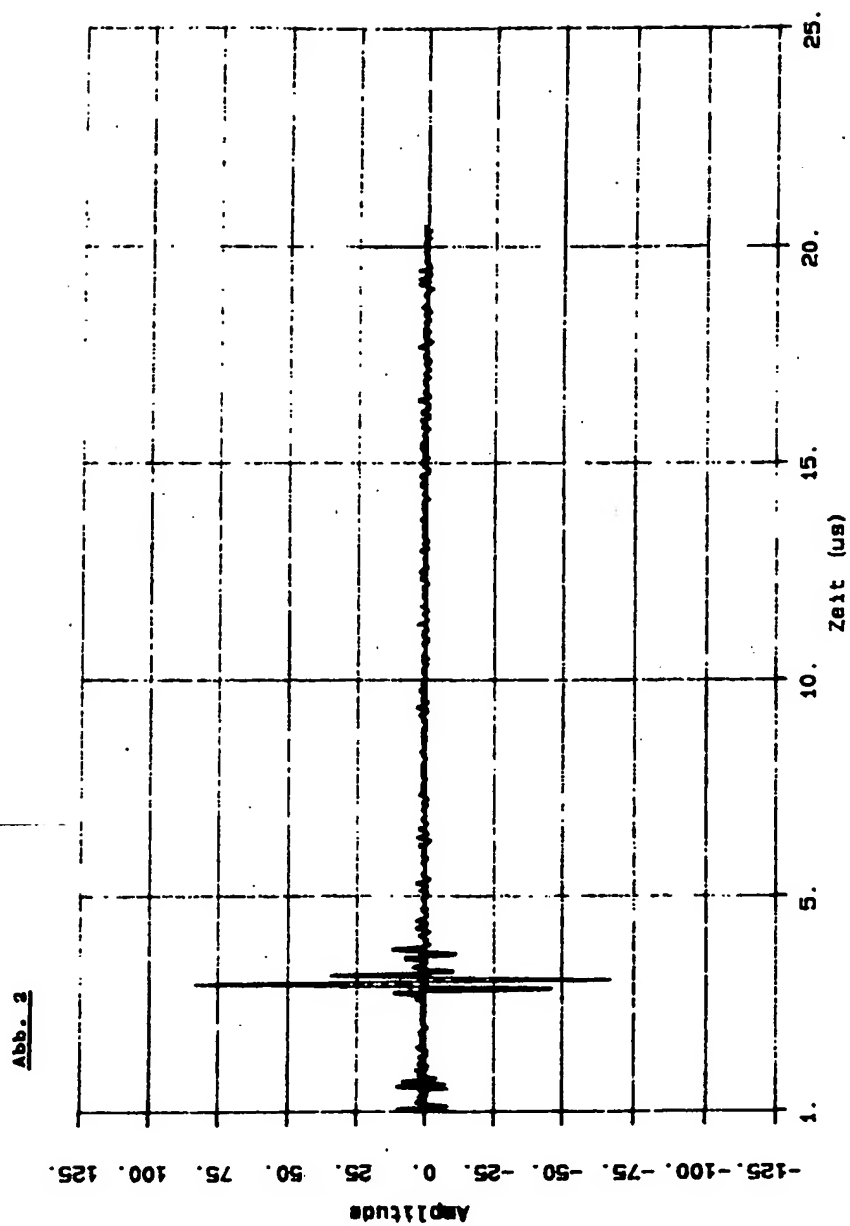
anschließend- gegebenenfalls nach Reinigung  
- die so erhaltenen Mikropartikel mit einer wäß-  
rigen Lösung, die - bezogen auf die Aldehyd-  
menge - bis zu äquimolare Mengen an Kopp-  
lungsagenz sowie 0 bis 20 % , vorzugsweise  
0,01 bis 10 % w/v Tensid(e) bezogen auf das  
Gesamtvolumen enthält, unter Rühren bis zu 3  
Tagen, vorzugsweise bis zu 2 Tagen, bei Tem-  
peraturen von 0° bis 60 °C, vorzugsweise 5°  
bis 30 °C, bei einem pH-Wert von 3 bis 9,  
vorzugsweise 5 bis 8, umsetzt und - ge-  
wünschtenfalls nach Reinigung - diese gege-  
benenfalls an Bio- oder Makromoleküle bindet.

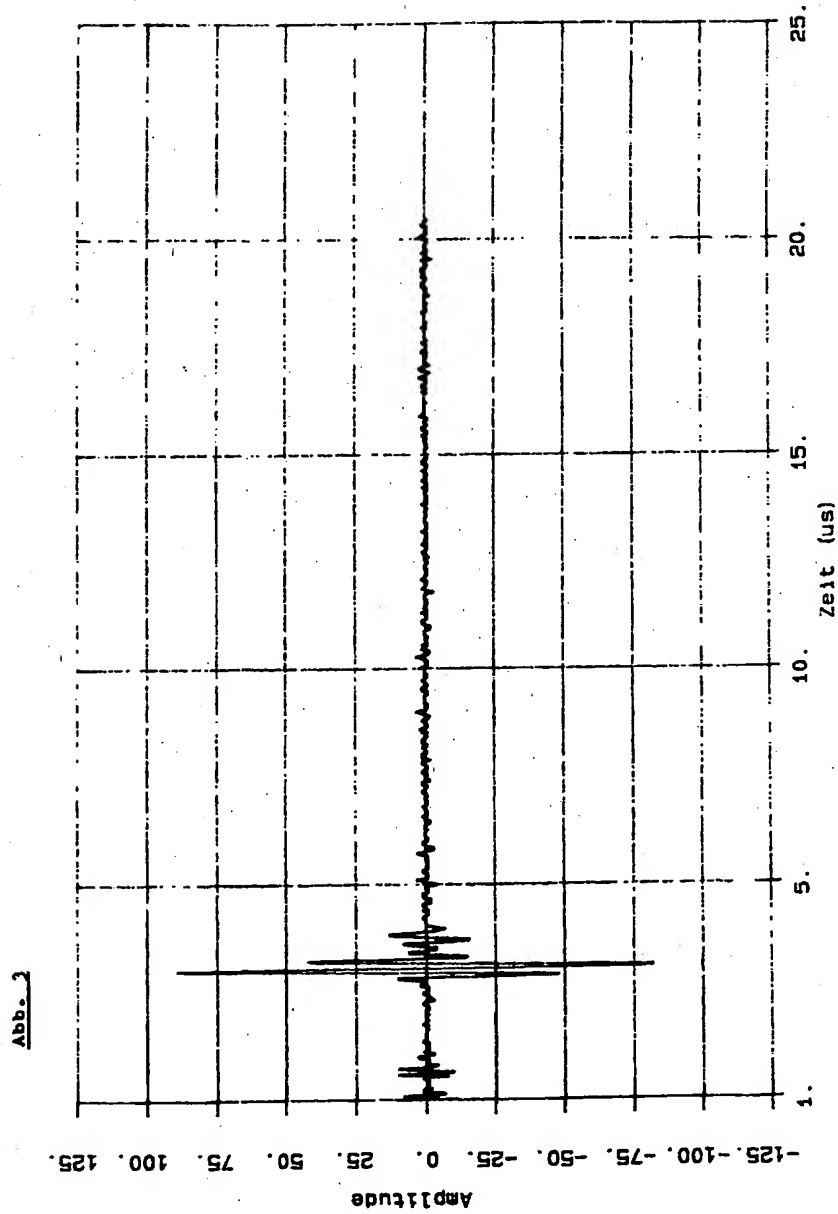
13. Verfahren zur Herstellung der pharmazeuti-  
schen Mittel nach Anspruch 2, dadurch ge-  
kennzeichnet, daß man die in Wasser gelosten  
oder suspendierten Mikropartikel, gegebenen-  
falls mit den in der Galenik üblichen Zusätzen,  
in eine für die enterale oder parenterale Appli-  
kation geeignete Form bringt.

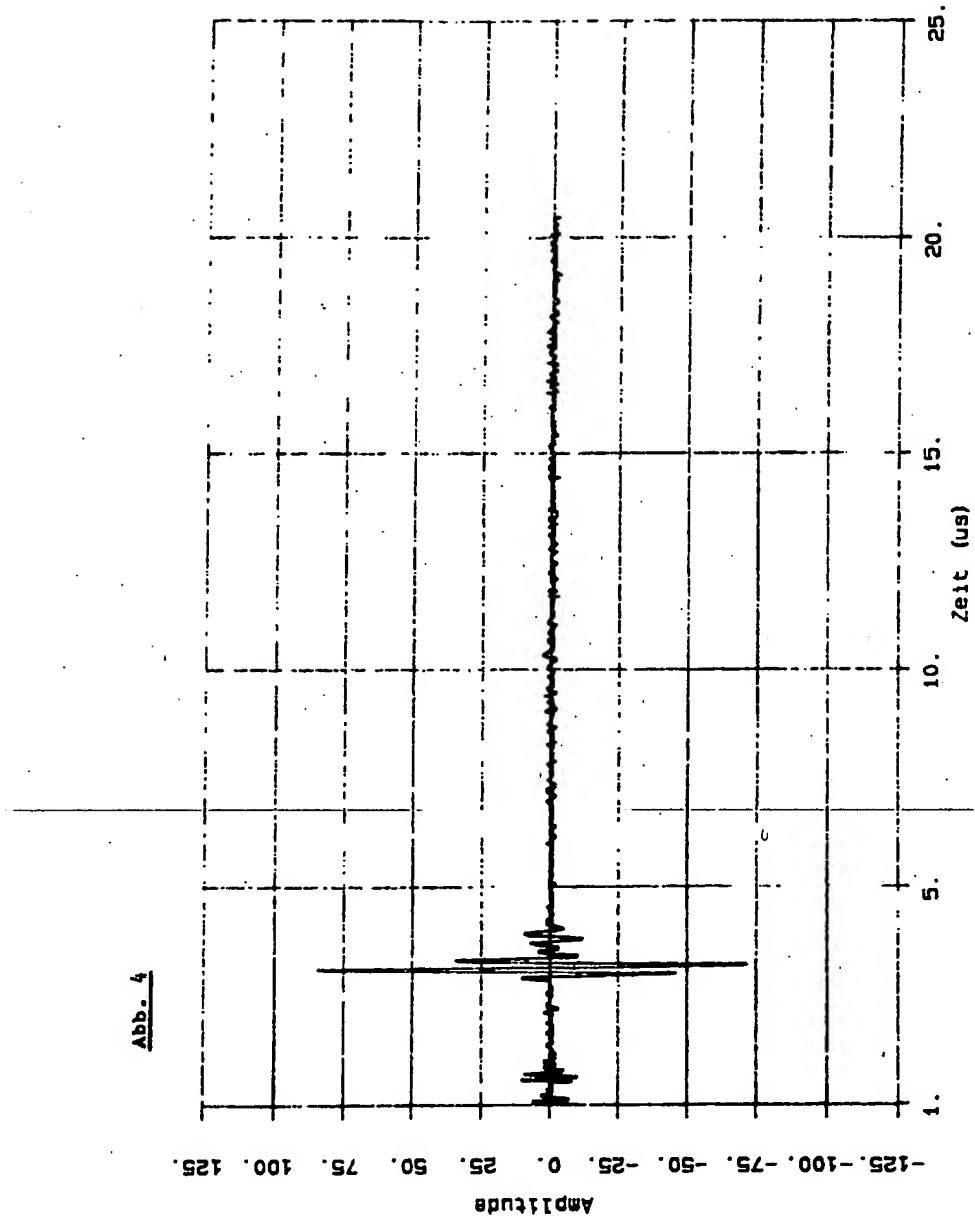
14. Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch ge-  
kennzeichnet, daß sie einen Durchmesser von  
0.1 bis 40  $\mu$ m haben.

15. Pharmazeutische Mittel nach Anspruch 2, da-  
durch gekennzeichnet, daß die Konzentration  
der Mikropartikel 1  $\mu$ g bis 100 mg pro ml,  
vorzugsweise 10  $\mu$ g bis 1 mg pro ml, galeni-  
scher Formulierung beträgt.



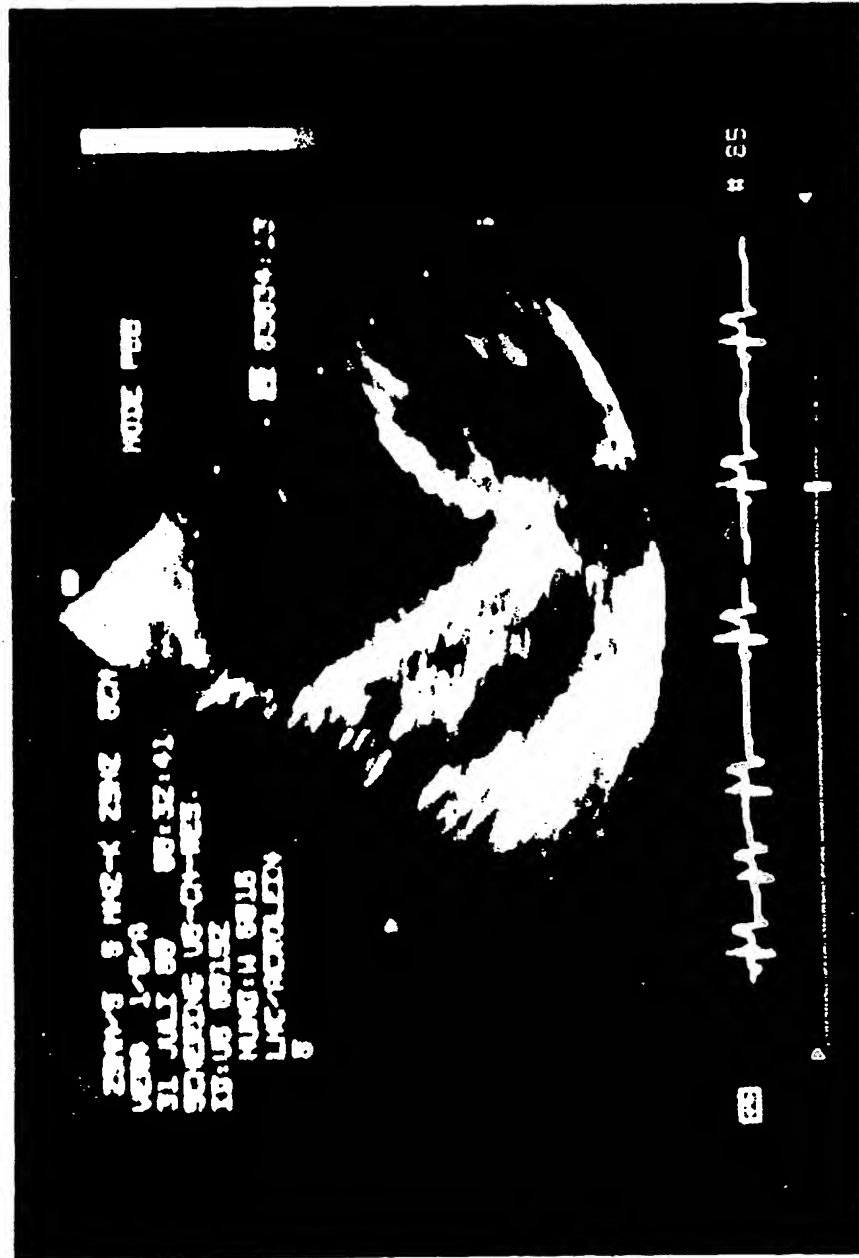






BEST AVAILABLE COPY

Abb. 5



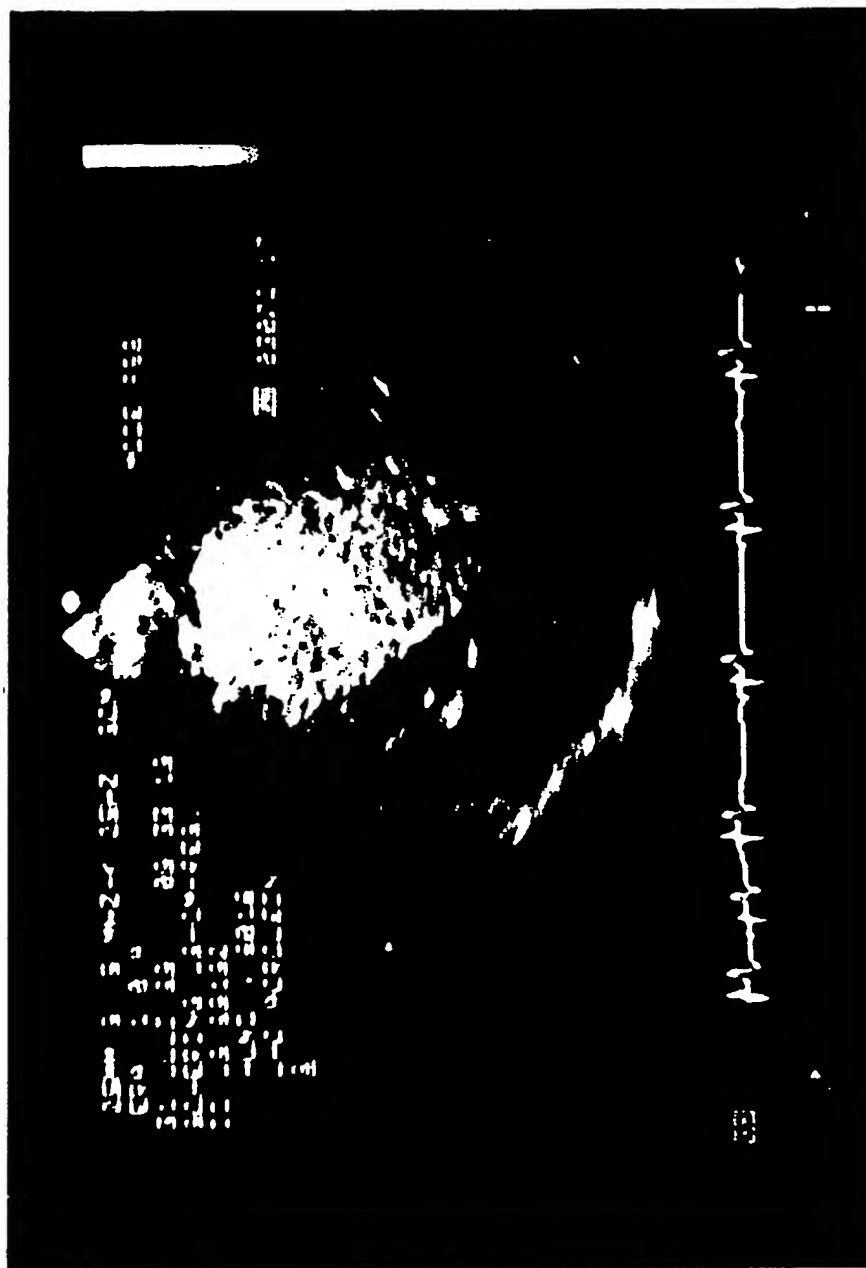


Abb. 6

BEST AVAILABLE COPY

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---